神経軸索の分布について (生命科学データの統計解析と数学モデル)

有田, 清三郎; 宮本, 義洋; 仮谷, 太一

数理解析研究所講究録
384巻 1980年 143-160

神経軸索の分布について

川崎医大（数学）　有田清三郎
〃　（形成）　宮本義洋
〃　（数学）　仮谷太一

§1. いとぐち

神経の再生過程は未だ解明されていないが，魅惑にとりかこまれた神秘の世界である．　神経移植や神経縫合の最終目標は機能の完全な回復であるが，この目標を達成するか否かの鍵は第一に再生神経の太さと数による．　神経移植や縫合術の成績を評価するひとつの数量的な指標として，再生軸索の個数や径が用いられているが，再生メカニズムが未知のためそれらの計量や総合的な評価に混乱が生じている．本稿ではラットの腓骨神経について種々の神経移植を施し，中枢側，末梢側の術後の電顕写真像から軸索の個数と径に注目し，次の問題について統計的な考察を行った。

問題１）　再生率をどんな $index$ で表わすべきか？一再生軸索の個数や径はどんな分布をするか。

問題2)　軸索はどんな空間パターンを構成しているか?

まず§2で神経軸索の簡単な概略,§3で神経移植の実験方法について述べ,§4で問題1)について実験データに基づきχ^2検定を行い軸索の個数は正規分布,軸索径は対数正規分布でほぼ近似できることを示した。§5では問題2)について軸索を座標で代表させ,種々の距離を算出してランダム性の検定により,空間パターンを均一,ランダム,集塊の3つに分類した。§6で問題1),2)の結果と二,三の考察を行った。

§2.神経軸索と再生神経

図1は神経(*Neuron*)及び神経軸索(*axon*)の模式図である.

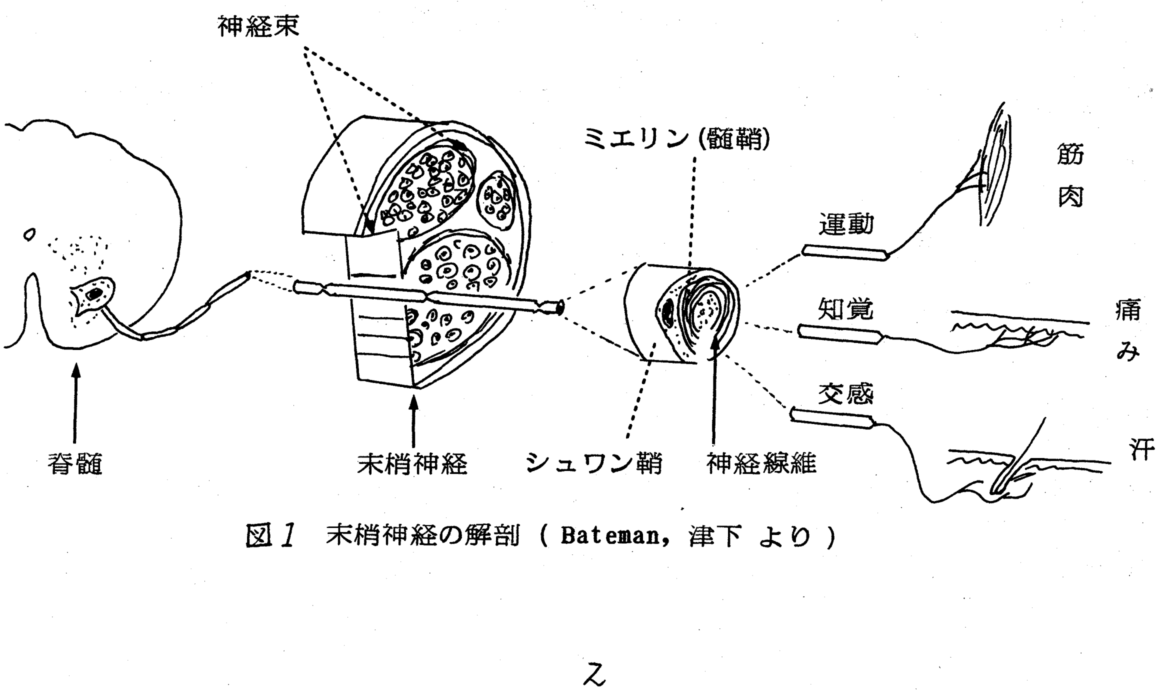


図1　末梢神経の解剖(Bateman,津下 より)

神経軸索のうちで，シュワン細胞で髄鞘化されたものを有髄神経（myelinated axon），髄鞘化されていないものを無髄神経（unmyelinated axon）という。通常の“神経”とはこれら有髄，無髄の数千本の神経線維が束となって神経束を形成，さらにいくつかの神経束により最終的に神経幹を形成する。また，末梢神経では運動，知覚，副交感神経などが混在しており，運動神経と一部の知覚神経が有髄，他は無髄の形態をとっている。神経線維は切断などによる損傷及び，その修復としての縫合を経由すると縫合部中枢側で多数の無髄の芽（sprout）が発芽され縫合部を経て末梢側に到達する。この間に伸長した無髄線維はシュワン細胞により包絡されて有髄化する。このような神経の再生過程では，再生axonの通過する経路は，種々の縫合術式とそれに伴う結合織の形成，個体の再生能力などランダムな要因を含んでいるため，再生axonの末梢側への到達や有髄化には成功や失敗が生じる。したがって神経線維の再生過程を確率過程として把えることができる。

§3.神経移植の実験方法

ラットの腓骨神経について，方法Ⅰ～Ⅳの神経移植を施し切断後ただちに縫合した。観測部位はA，B，Cの3ヶ所観測時刻は縫合術後4週より24週まで4週間隔である。上記3か所の超薄切片を作り透過電顕により2100倍でランダムに10ヶ所撮影，これを3倍

に引き伸し6300倍の印画写真を各部位につき10枚作成した。この計測領域は全体の1/10～1/8である。これら電顕写真より軸索個数及び軸索の長径，短径を計測した。

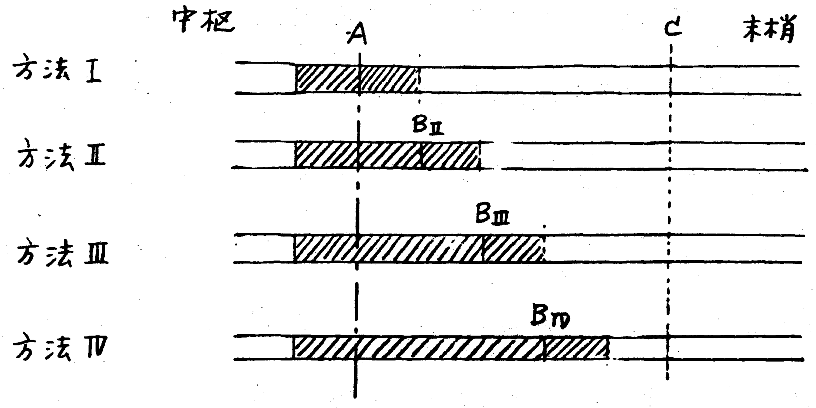


図2. 種々の神経移植(方法I～IV)

§4.神経軸索の分布

神経移植や縫合術の種々の方法の良否を比較するためには“再生率”や“回復率”という言葉が使用されるが，現実にはこの言葉に適切な物さしが確定していない。機能回復を論ずるならば機能そのものの回復率を問題にしなければならないが，それには再生線維を計量評価することが最も重要である[1]。この評価の指標として再生線維の径と個数があげられる[2]。径が大きく数も多いものが良結果であろうが，実際には再生線維の個数は多いが，径は小さかったり逆に径は大であるが，個数が少ない結果に多々遭遇する[3～4]。

このような場合成績の判定に混乱が起こるし，また再生の

状態を経時的にグラフで表現しようとしても無理が生じ，縫合的に再生率を表現する指標が必要である[5)~6)]。この指標が“軸索の占める総面積”で表示されるとするならば$\pi\times$(平均径)$^2\times$（平均個数）が変量と考えられる[2)]。しかしながら，実際の測定では再生有髄線維は必ずしも円型でなく楕円又は凸，凹型と種々に変形している。これは標本作製上の技術的問題だけではないと考えられるし，そうであったとしても再生実験において長期間の追試を要するため再手術は困難である。

したがって，実際の測定にあたり径には長径と短径とを計測した。我々はこれまで（長径＋短径）/2の補正を行い平均径を算出してきた。これは径のみにおいて議論する場合には問題は比較的少ないが，これをそのまま平均径として使用した再生率の算出には無理が生ずることに気付いた。

ここでは，ラット腓骨神経の移植実験のデータに基づきどんな換算が必要であるか，そのために軸索の個数や軸索径はどんな分布をしているかを検討した。検討の対象としたのは短径，長径，（長径＋短径）/2，$\sqrt{長径\times短径}$及び上記4つの変量を対数変換した計8変量及び個数の9変量である。軸索の個数，軸索径のヒストグラムは術後の経過時間，部位及び移植の方法によって異なるが形状は下に示されるように単峰性を示した。図3はNormalについての図4は16週につい

ての軸索個数，軸索径のヒストグラムである。これら変量の平均値(μ)，S.D.(σ)を算出し，その一部を表1で示した。ただし表~~1~~のaxon径は(長径＋短径)/2 を意味する。このμ，σに基づく正規分布を構成して6分割によるχ^2−適合度検定(自由度3)を行なった。χ^2検定の結果は表2,3 の通りである。

表1. 神経移植による再生axonの時間的変化

(ラット. 腓骨，数値は平均値，( )はS.D.)

方法＼部位		A axon数	A axon径	B axon数	B axon径	C axon数	C axon径
4W	I	1.75(1.25)	2.28(0.93)			0.08(0.32)	2.29(0.69)
	II	3.05(1.58)	1.89(0.71)	1.13(1.01)	1.41(0.73)	0.36(0.65)	1.28(0.53)
	III	0.63(1.03)	1.88(0.60)	0.61(1.05)	1.42(0.65)	non-recovery	
	IV	1.61(1.15)	1.78(0.61)	1.76(1.10)	1.78(0.60)	non-recovery	
8W	I	3.70(1.05)	2.19(0.89)			4.28(1.68)	1.76(0.67)
	II	4.55(1.75)	2.04(0.84)	4.24(1.34)	2.02(0.94)	2.91(1.39)	1.94(0.79)
	III	3.93(1.48	2.05(0.93)	3.21(1.50)	2.06(1.06)	2.96(1.29)	1.99(0.77)
	IV	4.28(1.35)	2.25(0.85)	4.25(1.57)	1.93(0.81)	1.93(1.42)	1.79(0.75)
12W	I	5.19(1.91)	1.79(0.82)			4.60(1.53)	2.09(0.98)
	II	4.38(1.25)	2.18(1.35)	4.56(1.37)	1.64(0.73)	5.64(1.83)	1.89(1.76)
	III	5.22(1.16)	1.78(0.80)	4.99(1.72)	1.98(0.96)	2.21(1.16)	3.50(1.49)
	IV	3.45(1.28)	2.07(0.91)	4.65(1.37)	2.21(1.03)	3.02(1.41)	2.03(0.77)
NORMAL		2.05(1.03)	3.53(8.76)				

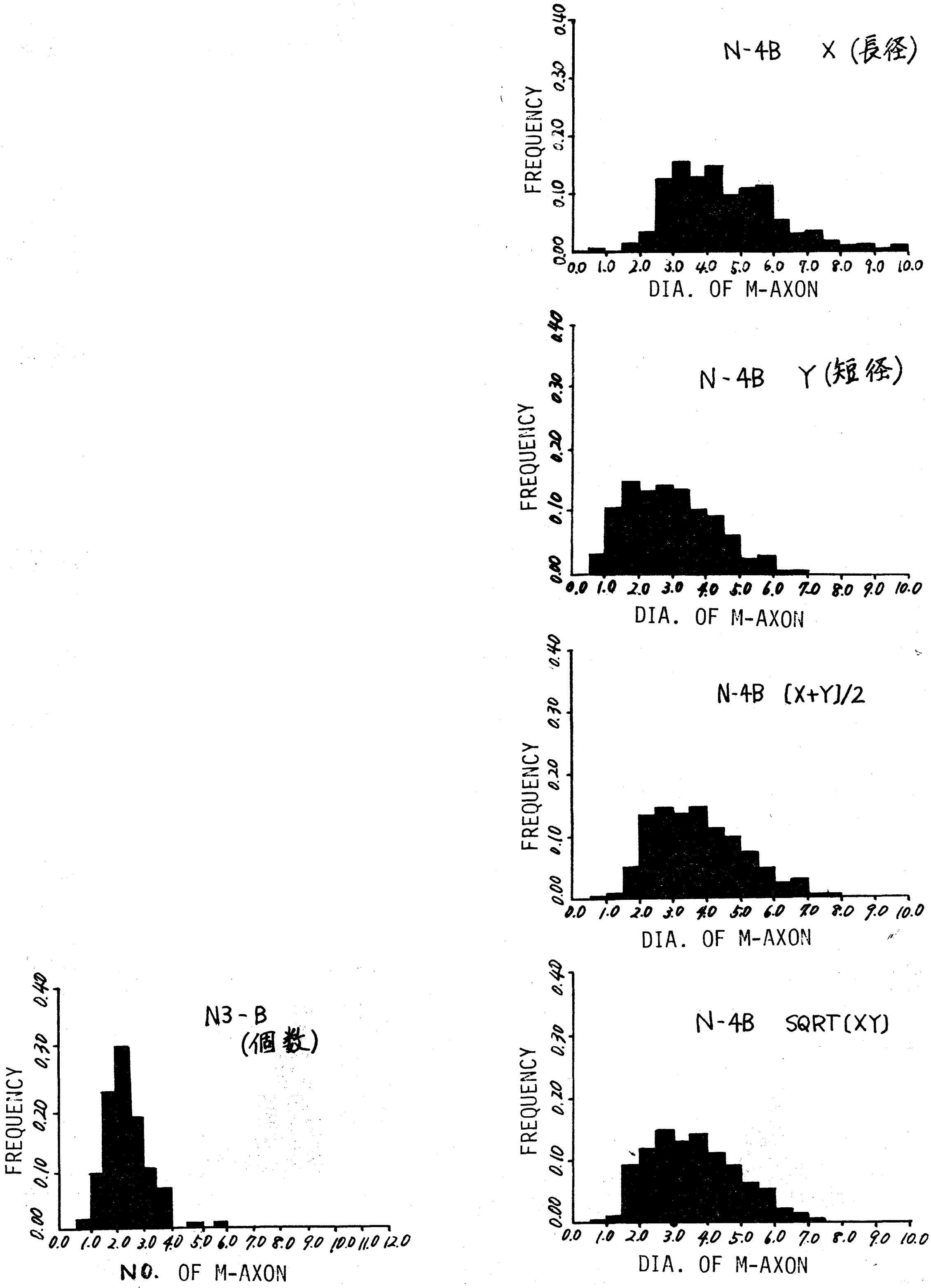
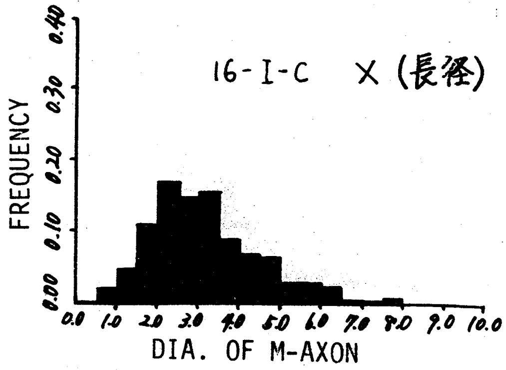
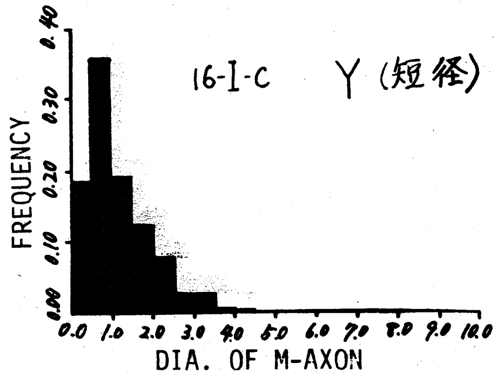
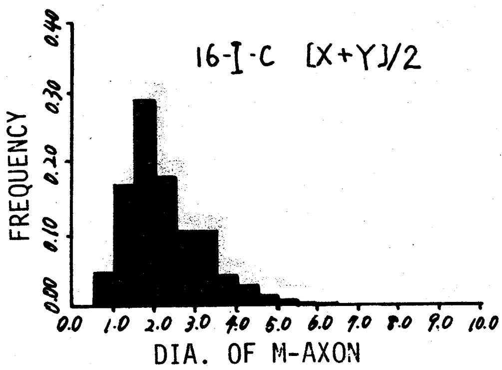
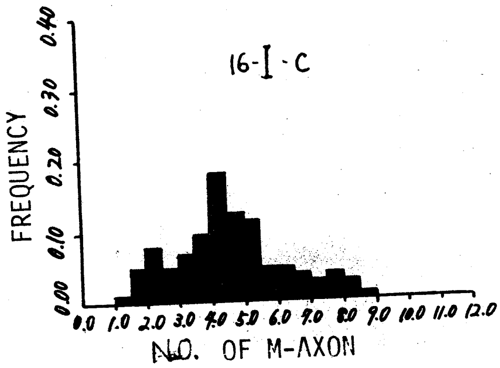


図3. AXON数.径のヒストグラム(Normal)









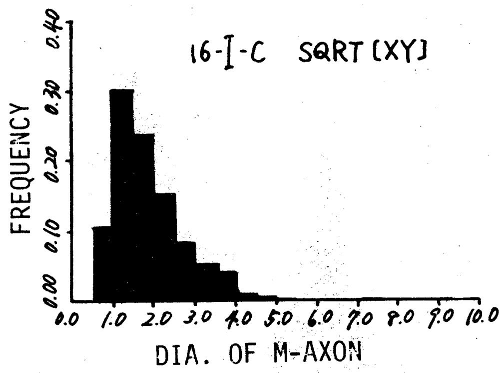


図4. AXON数, 径のヒストグラム(再生16週)

表2 AxoN数の正規分布に対する適合度検定
(χ^2-test. +(0.10), *(0.05), **(0.025), ***(0.01))

	4週	8週	12週	16週	20週	24週	NORMAL
I-A							
I-AB					†		
I-C						+	
I-A							
I-AB							
I-C			*			+	
II-A							
II-B							
II-C		***					
II-A	**						
II-B	***						
II-C							
III-A	***			*			
III-B							
III-C		*	+	*			
III-A	***		*				
III-B		**	+				
III-C		***		+			
IV-A							
IV-B							
IV-C				*			
IV-A				†			
IV-B							
IV-C							

表3　AXON径についての正規分布に対する適合度検定

（χ^2－test.　Xは長径，Yは短径を示す）

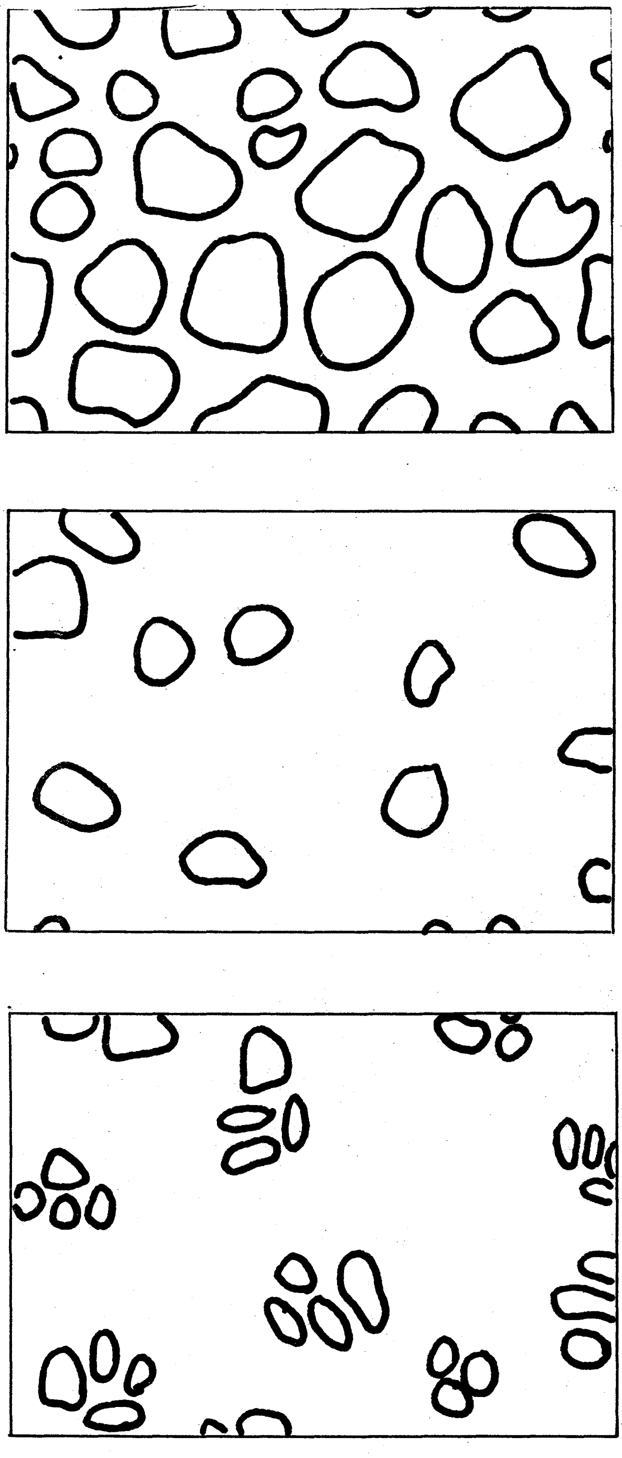
		X	Y	$\frac{X+Y}{2}$	$\sqrt{XY}$	LOG(X)	LOG(Y)	LOG $\frac{X+Y}{2}$	LOG $\sqrt{XY}$
NORMAL	N4—A								
	N2—B		+						
	N3—B			+				+	
	N—4B	**							
	N4—B								
	N3—C								
16週	Ⅰ—C	***	***	***	***		+		+
	Ⅱ—A	*	***	***	***	***	+		
	Ⅱ—B	***	***	***	***	***	***		
	Ⅱ—C	+	***	***	***		**		
	Ⅱ—A	***	***	***	***	+			
	Ⅱ—B	*	***	*	***	***			
	Ⅱ—C	***	***	***	***	+			
	Ⅲ—A	***	***	***	***		**		
	Ⅲ—B	***	***	***	***				
	Ⅲ—C	***	***	***	***		+		
	Ⅲ—A		***	**	***	***	*		
	Ⅲ—B	***	***	***	***	***	***	***	***
	Ⅲ—C	***	+	***	**	***			
	Ⅳ—A	**	***	***	***	+	*	+	
	Ⅳ—B	***	***	***	***		***	*	
	Ⅳ—C	**	***	***	***				
	Ⅳ—A	***	***	***	***		**		
	Ⅳ—B	***	***	***	***	***	***		
	Ⅳ—C	+	+			+			

§5. 神経軸索の空間パターン

末梢神経の横切電顕標本を観察すると，正常では有髄線維は一見一様に分布し，無髄線維は集塊をなしている。この空間に分布した配置（以下これを空間パターンと称する）は一度切断され，再生過程になると全く様式を異にする。また経時的にも様式が変化しているように思える。我々はこの空間パターンの変化が神経再生の成熟度を表現する指標となるのではないかと考え軸索の空間パターン解析を試みた。第一の試みとして空間パターンを①均等に分布②ランダムに分布③集塊の３つに分類し，Hopkins & Skellam[8] のランダム性の検定方法による統計量A及びxを使用して解析を行った。

5-1. Hopkins & Skellam の検定

Hopkins & Skellam の検定はパターンがランダムにあるときに限り，ランダムの点とそれの最近接個体との距離の分布は，ランダムに選ばれた個体とその最近接個体との距離の分布に等しいということに基づいている。w_1をランダムに選んだ点とその最近接個体の距離の平方，w_2をまず個体をランダムに選び，その選ばれた個体の最近接個体との距離の平方とする。パターンがランダムならば統計量 $A=\Sigma w_1/\Sigma w_2$ の期待値は１でありA＞１ならば集塊，A＝１ならばランダム，A＜１ならば一様に分布している。



(i) 均 一　$A < 1$

(ii) ランダム　$A = 1$

(iii) 集 塊　$A > 1$

図5. 空間パターンの分類

Aの値が1から有意と見なせるだけはずれているかどうかを決めるために$x=A/(1+A)$の標本分布を求める。

<u>Proposition</u>　$E(x)=\frac{1}{2}$，$Var(x)=\frac{1}{4(2n+1)}$

（証明）

$$x=\frac{\sum W_1}{\sum W_1+\sum W_2}=\frac{a}{a+b} \tag{1}$$

とおく。いま単位円当りの軸索の平均個数が1となるように距離の単位を自由に選ぶことができる。このとき，$\sum W_1=n\overline{W_1}=a$の$p.d.f.$は

$$f(a)da=\frac{a^{n-1}e^{-a}}{\Gamma(n)}da,\quad f(a)db=\frac{b^{n-1}e^{-b}}{\Gamma(n)}db \tag{2}$$

となる[7]。(1)より　$a=bx/(1-x)$

固定されたbに対して　$g(x|b)dx=f(a)da$ (3)

ところが　$da=b\dfrac{dx}{(1-x)^2}$　だから

$$g(x|b)dx=\frac{1}{\Gamma(n)}\frac{b^n x^{n-1}}{(1-x)^{n+1}}\cdot exp\left(\frac{-bx}{1-x}\right)dx \tag{4}$$

$$\therefore g(x)dx=\int_0^\infty f(b)db\cdot g(x|b)dx$$

$$=\frac{1}{[\Gamma(n)]^2}\cdot\frac{x^{n-1}}{(1-x)^{n+1}}\cdot\frac{\Gamma(2n)}{(1-x)^{-2n}}dx \tag{5}$$

$0\leqq x\leqq 1$で　$g(x)=\dfrac{x^{n-1}(1-x)^{n-1}}{B(n,n)}$ (6)

$$\therefore E(x)=\frac{B(n+1,n)}{B(n,n)},\quad E(x^2)=\frac{B(n+2,n)}{B(n,n)} \tag{7}$$

$$\therefore E(x)=\frac{1}{2},\quad Var(x)=\frac{1}{4(2n+1)} \tag{8}$$

nが十分大きいとき　$\dfrac{x-E(x)}{\sqrt{Var(x)}}=2(x-\frac{1}{2})\sqrt{2n+1}$

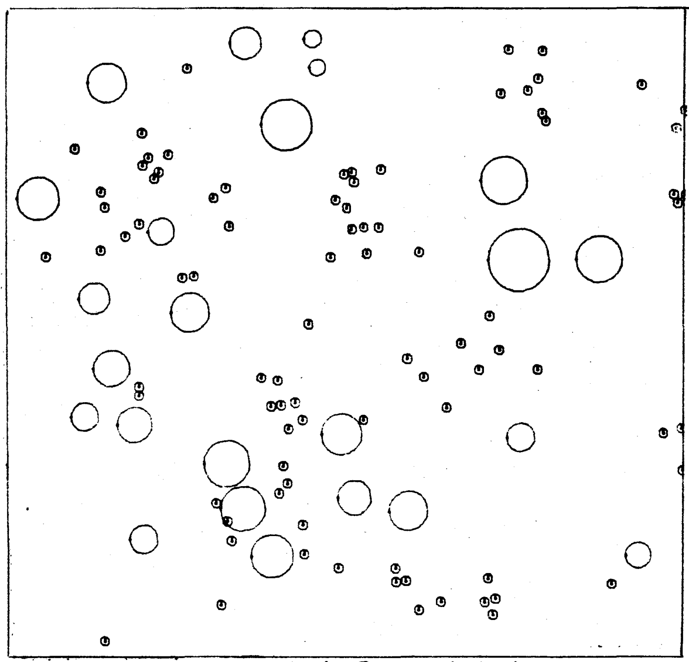
は$N(0,1)$で近似される。（証明終）

5-2. 空間パターンの数値例

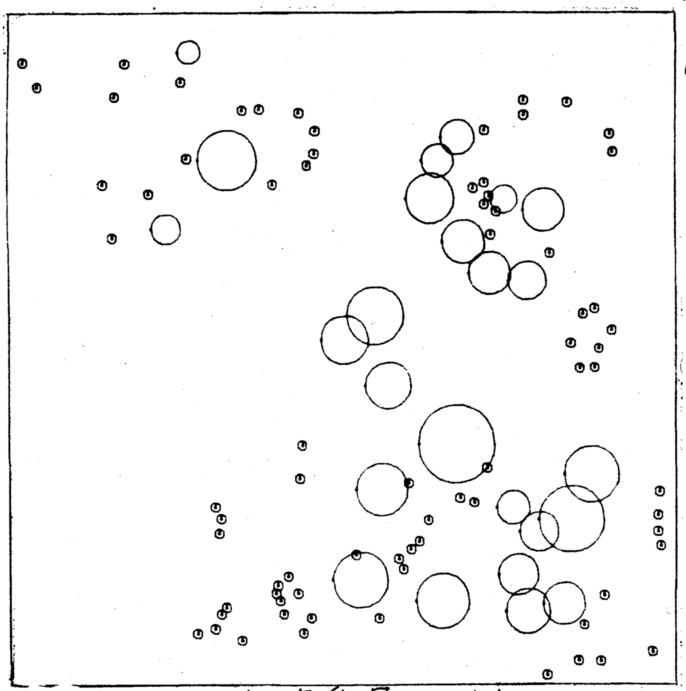
図6の(i),(ii)は電顕写真を基にグラフペン ミニコンNOVA-01で神経軸索の中心の座標と径を計測し,シミュレートし,図示したものである。
(大円は有髄,小円は無髄を表わす)

有髄軸索について

(i) 写真番号4451では $A=0.982$, $x=0.495$, $\sqrt{Var(x)}=0.006$でランダム,(ii)写真番号4452では $A=4.818$, $x=0.828$ $\sqrt{Var(x)}=0.005$で集塊と判定された。



(i) 写真番号 4451



(ii) 写真番号 4452

図6. 有髄・無髄の空間パターン

§6.考察

1）有髄軸索の個数はほぼ正規分布で，また軸索径では長径と短径の相乗平均が対数正規分布で近似できることが示された。個数の正規分布近似は標本抽出や空間分布を検討するなど今後の統計解析の基礎となるであろう。軸索径については軸索を楕円で近似して考えれば相乗平均の2乗は楕円の面積に比例するため，軸索の面積が対数正規分布すると考えられる。したがって軸索を今後理想化して半径が対数正規分布する円と考え種々の解析を推しすすめてゆくことも可能であろう。

2）軸索の分布を個数についての分布と径についての分布とわけ別々に考察してきたが，個数と径の関係や軸索面積と個数の関係など本来ひとまとめにして考えるべきであろう。また問題1で算出された平均値，S.D.などの統計量と問題2との関連づけの検討も重要であろう。

3）Normalの分布と再生時の分布は異なっており，再生の分布は時間経過とともに変化し，かつ再生の最終時点での分布が縫合術式や部位，再生能力などにより必ずしも一定していない。また再生軸索の個数はNormalにくらべて増加している個所が表1にみられるが，シュワン細胞突起などによる計測ミスがなければ再生過程に分枝現象が生じているものと思われる。

4）空間パターンについては距離による解析ではClark & Evans のRやPielou & Maunt ford のα，また比V/mやDavid & Moove の集合度指数I，Lloyd の集落指数m^*，Movisita の分散指数I_δなど多くの指標が提案されておりこれらの比較検討も試みられている。[9)~14)] 神経軸索の空間パターン分析ではどんな指標を採用してゆくかが今後の課題である。

5）今回は有髄神経について検討したが，無髄についても検討を加え，有髄，無髄2種類の混在した空間パターンの解析が，今後の研究課題となろう。

謝辞：

本研究は多大の労力を要し，多くの方々から献身的な協力をいただきました。動物実験と組織切片の作製，約4000枚の電顕写真に川崎医大形成外科藤原和子嬢，データ整理とデータパンチに数学教室吉崎佳子嬢，コンピュータセンタ平松朋子嬢，そして終始コンピュータ処理に尽力いただいたコンピュータセンタ掘義己氏。ここに心から感謝の意を表します。

参考文献

[1] Holmes, A.and J.Z. Young: Nerve regeneration after immediate and delayed suture, J. Anat., 77(63), 1942.

[2] Gutmann, E.and F.K. Sanders: Recovery of fibre numbers and diameters in the regeneration of peripheral nerves, J. Physiol., 101, 1943.

[3] Nomura, S. Functional recovery-Degeneration and regeneration, Tokyo, Igakushoin, 1975.

[4] Matsuda, H. et al.: Stochastic model of regenerating axons at the site of nerve suture, Seikeigeka, 28(13), 1977.

[5] Arita, S.,Kariya, T.and H. Matsuda: Stochastic model for the process of regeneration of nerve fibers passing through the site of nerve suture, Proceeding of ICCS, 1978.

[6] Miyamoto,Y.,Watari, S.& K. Tsuge: Experimental studies on the effects of tension on intraneural microcirculation in sutured peripheral nerves, Plast. & Rec. Surg., 63(3), 1979.

[7] Hoel, P: Introduction to Mathematical Statistics, New York, Wiley & Sons, 1954.

[8] Hopkins, B. and J.G. Skellam: A new method for determining the type of distribution of plant individuals, Ann. Bot. Lond. N.S. 18, 1954.

[9] Clark, P.J and F. Evans: Distance to nearest neighbor as a measure of spatial relationships in populations, Ecology, Vol.35, No.4, 1954.

[10] David, F.N. and P.G. Moore: Notes on contagious distributions in plant populations. Ann. Bot. Lond. N.S. 18, 1954.

[11] Morisita, M: Measuring the dispersion of individuals and analysis of the distributional patterns., Mem. Fac. Sci. Kyushu U. Series E. (Biology) 2, 1959.

[12] Lloyd, M: Mean crowding, J. Anim. Ecol. 36., 1967.

[13] Pielou, E.C.: An introduction to Mathematical Ecology., John Wiley & Sons, 1969.

[14] Hines, W.G.S. and R.J. O'Hara Hines: The Eberhardt statistic and the detection of nonrandomness of spatial point distrikutions., Biometrika, 66, 1, 1979.